[illegible]

[illegible]

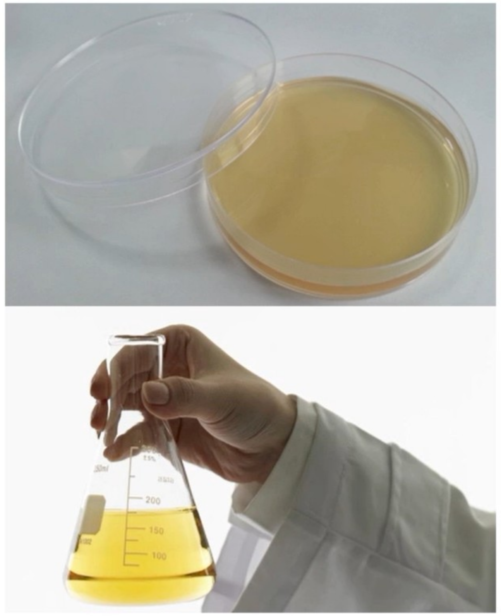
03

研究和应用微生物的前提（也是发酵工程的重要基础）是：

防止杂菌污染，获得纯净的微生物培养物。

□□□□

□□□□□□



一、培养基的配置

1. 概念

人们按照微生物对____营养物质____的不同需求，

配制出供其____生长繁殖____的营养基质。

[illegible]

2. [illegible]

划分标准	培养基种类	特点	用途
物理性质			

激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

[illegible]

2. [illegible]

划分标准	培养基种类	特点	用途
物理性质	液体培养基	不加凝固剂	扩大培养，工业生产
物理性质	半固体培养基	加凝固剂，如琼脂	观察微生物的运动、分类鉴定
物理性质	固体培养基	加凝固剂，如琼脂	微生物分离、鉴定、活菌计数、保藏菌种
化学成分			
化学成分			
用途			
用途			

激活 Windows

选择培养基类型

类型	条件	分离得到的菌种
改变培养条件	70～80℃ 的高温	耐热菌
添加某种化学物质	加入青霉素	酵母菌、霉菌等真菌
	高浓度食盐	耐盐菌
营养缺陷	不加碳源	自养型微生物
	不加氮源	固氮菌

思考1：如果让你配制一种培养基，将土壤稀释液中能分解尿素的细菌分离出来，培养基的配方该如何设计？**P18**

在选择培养基中，以尿素作为唯一氮源

（某些细菌能把尿素分解成NH3，是因为它们能合成___脲酶___）

选择培养基类型

类型	条件	分离得到的菌种
改变培养条件	70～80°C 的高温	耐热菌
添加某种化学物质	加入青霉素	酵母菌、霉菌等真菌
	高浓度食盐	耐盐菌
营养缺陷	不加碳源	自养型微生物
	不加氮源	固氮菌

思考2： 如何设置对照证明培养基有选择作用？

相同的菌液接种到牛肉膏蛋白胨培养基上，放在与选择培养基相同且适宜的条件下培养，若牛肉膏蛋白胨培养基上生长的菌落数目明显多于选择培养基上的数目，说明选择培养基具有选择作用。

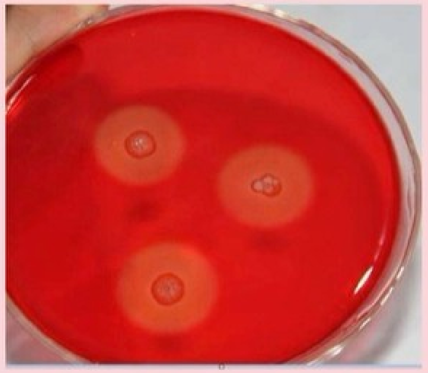
激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

□□□□□□□□

2. □□

（P30）深紫色

伊红-亚甲蓝培养基鉴别大肠杆菌



刚果红培养基鉴别纤维素分解菌

刚果红+纤维素 红色（P20）

划分标准	培养基种类	特点	用途
用途	选择培养基	在培养基中加入某种化学物质，以抑制不需要的微生物的生长，促进所需要的微生物的生长	培养、分离出特定微生物
	鉴别培养基		

激活 Windows

一、培养基的配置

3. 营养构成

（1）基本成分：碳源、氮源、水、无机盐

① 碳源

- 无机碳源：CO_2、CO_3^{2-}、HCO_3^- 等 —— 自养微生物
- 有机碳源：葡萄糖、牛肉膏、蛋白胨 —— 异养微生物

② 氮源

- 无机氮源：NH_4^+、NO_3^-、**N_2**（固氮微生物）、NH_3 等
- 有机氮源：牛肉膏、蛋白胨、尿素、氨基酸等

合成蛋白质、核酸等物质

含C、H、O、N的有机物是异养型微生物的碳源、氮源、能源

③ 无机盐

功能：维持细胞渗透压；酸碱平衡；参与细胞代谢活动

一、培养基的配置

3. 营养构成

（1）基本成分：碳源、氮源、水、无机盐

（2）特殊需求：满足微生物生长对pH、特殊营养物质以及O_2的需求。

① 培养乳酸杆菌时，需要在培养基中添加维生素；

② 培养霉菌时，需要将培养基调至酸性；

③ 培养细菌时，需要将培养基调至中性或弱碱性；

④ 培养厌氧微生物时，需要提供无氧的条件。

[illegible]

3. [illegible]

▼表1-1　1 000 mL牛肉膏蛋白胨培养基的营养构成

组分	含量	提供的主要营养
牛肉膏	5 g	碳源、氮源、磷酸盐和维生素等
蛋白胨	10 g	碳源、氮源和维生素等
NaCl	5 g	无机盐
H_2O	定容至1 000 mL	水

[illegible]

1. [illegible]
- [illegible]
- [illegible]

2. [illegible] [illegible]

3. [illegible]

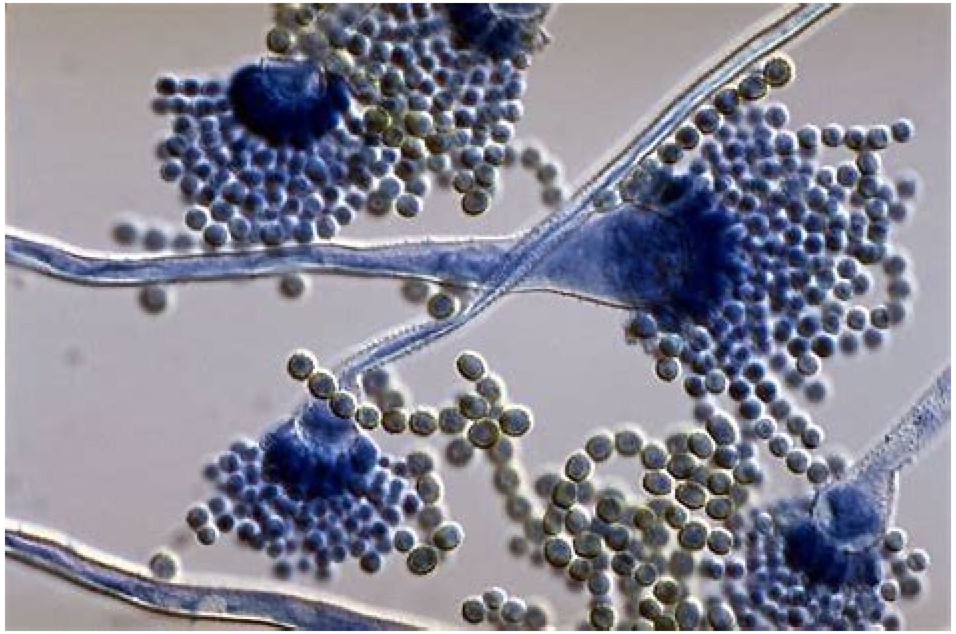
（1）消毒：是指使用较为<u>温和</u>的物理、化学或生物等方法杀死物体表面或内部一部分微生物。

（2）灭菌：是指使用强烈的理化方法杀死<u>物体内外所有</u>的微生物，包括芽孢和孢子。

激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

知识拓展

孢子：脱离亲本后能直接或间接发育成新个体的生殖细胞。



知识拓展

孢子：脱离亲本后能直接或间接发育成新个体的生殖细胞。

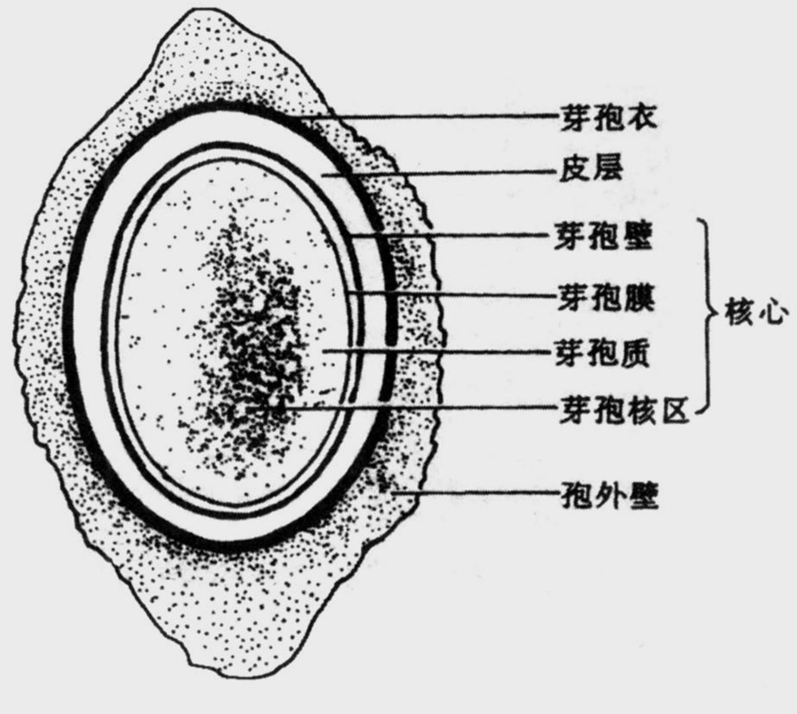
知识拓展

孢子：脱离亲本后能直接或间接发育成新个体的生殖细胞。

芽孢：细菌休眠体，含水量极低，抗逆性强。

恶劣环境下，一个细菌产生一个芽孢，条件适宜时重新成为一个细菌。

（不是繁殖体）



细菌芽孢构造模式图

二、无菌技术

（1）消毒

煮沸消毒法

100°C 煮 **5~6min** 。可杀死微生物的营养细胞和一部分芽孢。

巴氏消毒法

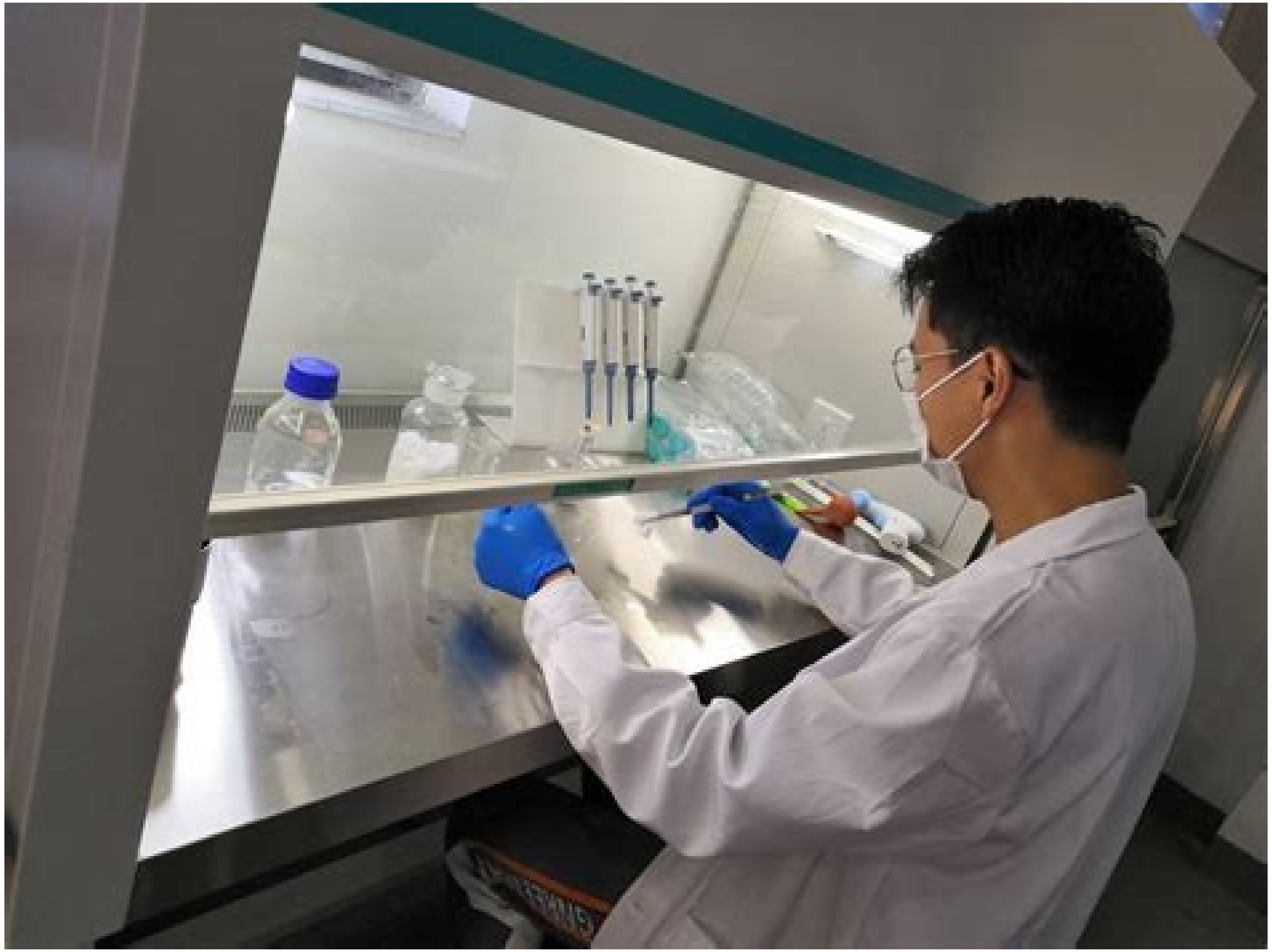
62~65°C 煮 **30min** 或 **80~90°C** 下处理 **30s~1min** 。可杀死绝大部分微生物，不破坏食物的营养成分。

化学药物消毒法

用 **75%** 酒精擦拭双手、用氯气消毒水源等。

紫外线消毒

对接种室、接种箱或超净工作台用紫外线照射 **30min** ，以杀死物体表面或空气中的微生物。



二、无菌技术

（2）灭菌

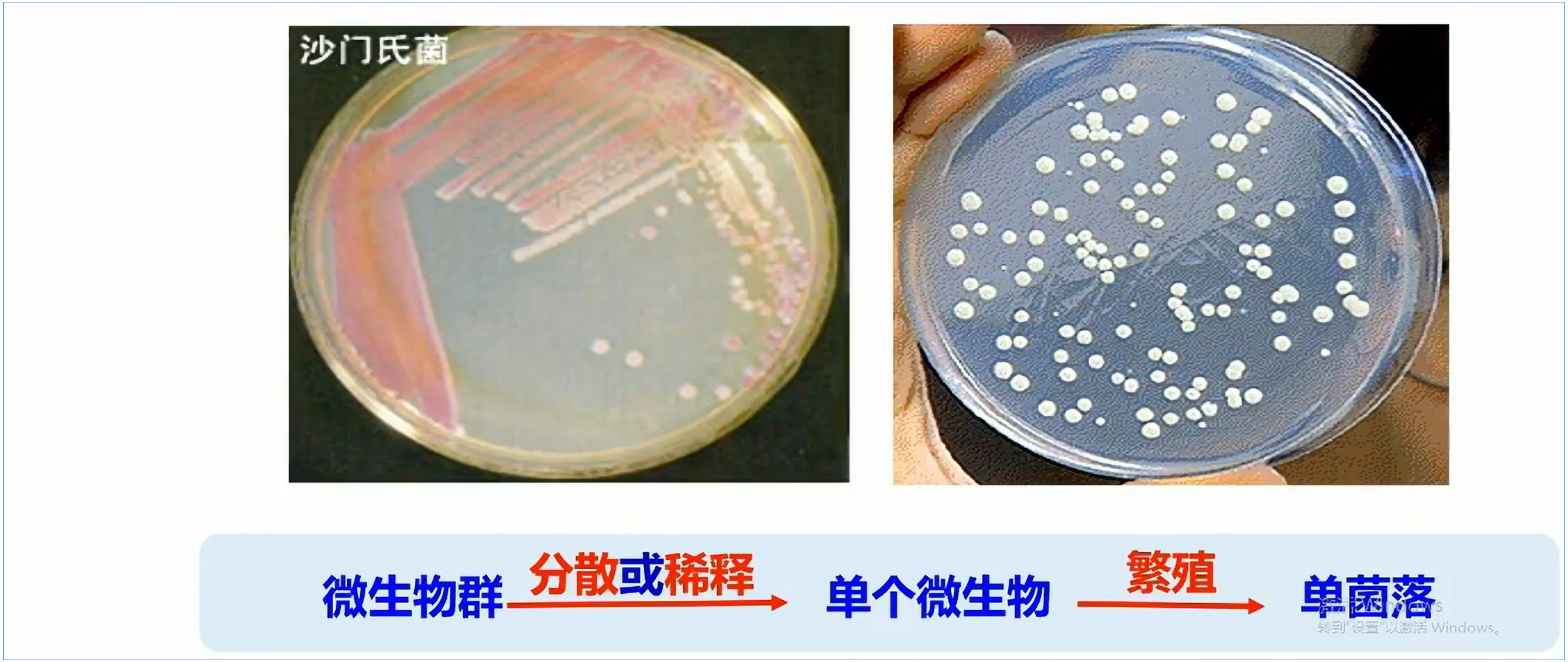
	类型	适用范围
灭菌	干热灭菌法	耐高温的，需要保持干燥的物品 ➢ 玻璃器皿（如培养皿） ➢ 金属器具（如针头、镊子、剪刀等）
	湿热灭菌 （高压蒸汽灭菌法）	培养基等
	灼烧灭菌法	在酒精灯火焰的____充分燃烧层____灼烧 ➢ 涂布器、接种环、接种针或其他金属器具； ➢ 试管口、瓶口等容易被污染的部位。

习题巩固

教材隐性知识

1. 选择性必修 3 P_{10}“ 相关信息”：生物消毒法是指利用生物或其____代谢物____除去环境中的部分微生物的方法。

2. 利用某些微生物可以净化污水、污泥，原因是________________有的微生物能够寄生于多种细菌体内，使细菌裂解_____________________。



5.

1. 概念

分散的微生物（单一个体）在适宜的________固体培养基表面或内部可以繁殖形成肉眼可见的、有一定形态结构的__________。

子细胞群体

2. 特征

形状、大小、光泽度、颜色、透明度等。

—— 是鉴定菌种的重要依据

3. 获得单菌落的方法

① 平板划线法

② 稀释涂布平板法

制备培养基 接种和分离 培养酵母菌

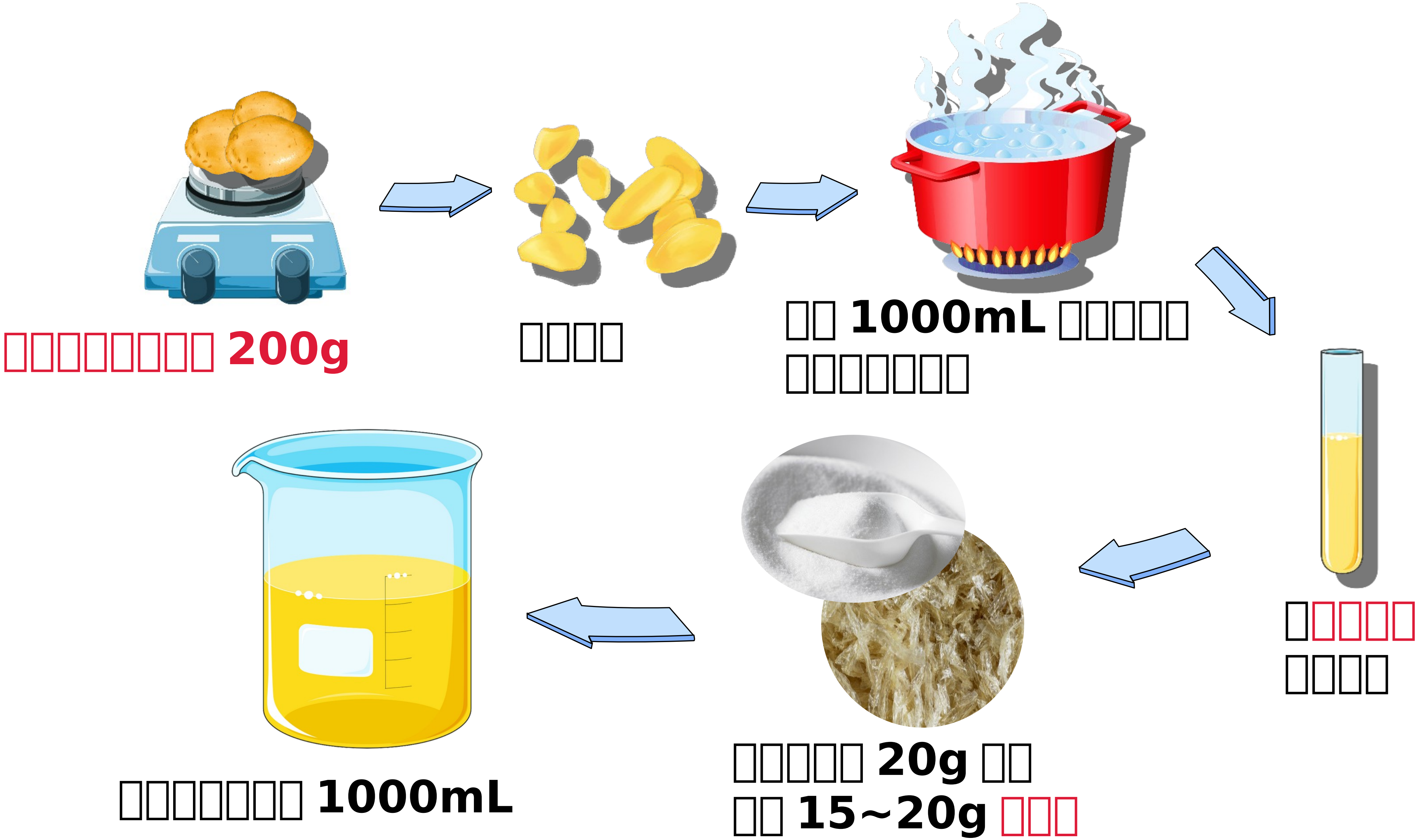
称取去皮的马铃薯200g 切成小块

加水 1000mL，加热煮沸
至马铃薯软烂。

用纱布过滤
得到滤液

滤液中加入20g葡萄
糖，15~20g琼脂。

用蒸馏水定容至 1000mL



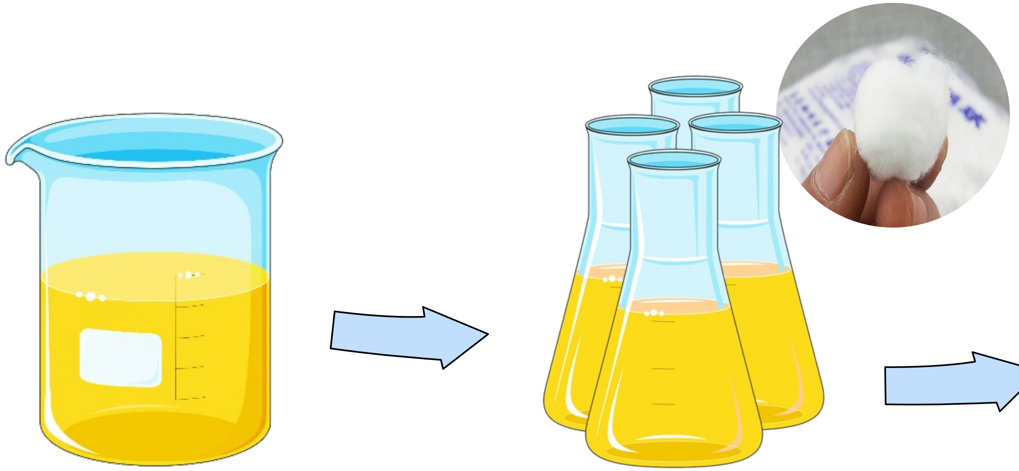
制备培养基 接种和分离 培养酵母菌

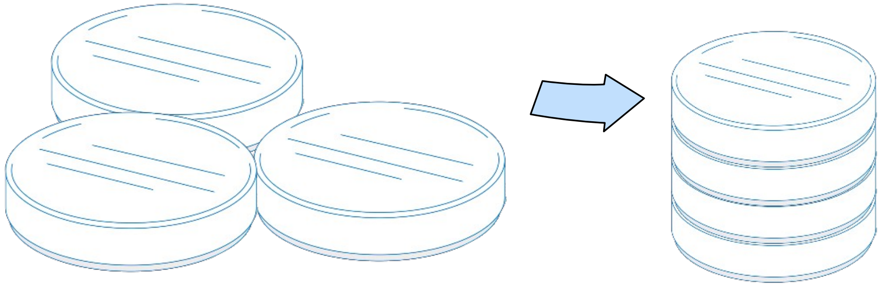
将配制好的培养基转移到锥形瓶中，加棉塞。 包上牛皮纸，
并用皮筋勒紧。

压力100kPa、温度为
121℃的条件下，高压蒸汽灭菌
15 ~ 30min。

取5 ~ 8套培养皿 培养皿叠成一束

放入干热灭菌箱内，160 ~
用几层牛皮纸包紧 170℃灭菌2h。

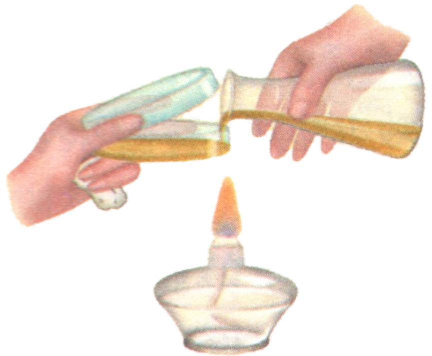




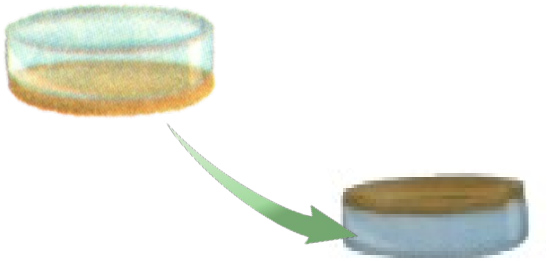
制备培养基 → **接种和分离** → 培养酵母菌

1 拔出锥形瓶的棉塞
。

2 将瓶口迅速通过火焰。



3 用拇指和食指将培养皿打开一条稍大于瓶口的缝隙，将培养基倒入培养皿（**10** ~ **20mL**），立即盖上皿盖。



4 翻转：等待培养基冷却凝固后，将培养皿倒过来放置。

倒平板注意事项

① 温度：培养基冷却至 **50°C** 左右 **;**

② 操作：在酒精灯火焰附近

③ 冷凝后平板倒置。

→ ① 防止培养基表面的水分挥发，

② 防止皿盖上的水珠落入培基，造成污染。

微生物群
连续划线
分散或稀释
单个细胞
生长繁殖
单个菌落

制备培养基 → **接种和分离** → 培养酵母菌

① 灼烧接种环，直至接种环金属丝烧红

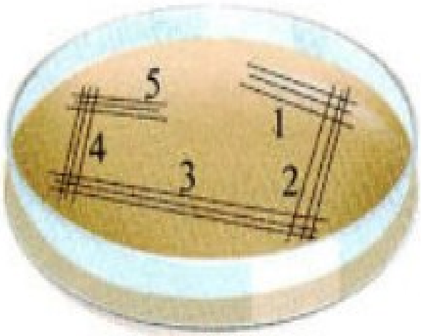
② 在火焰旁冷却接种环，拔出酵母菌培养液试管的棉塞

③ 试管口通过火焰

④ 在火焰附近用接种环蘸取一环菌液

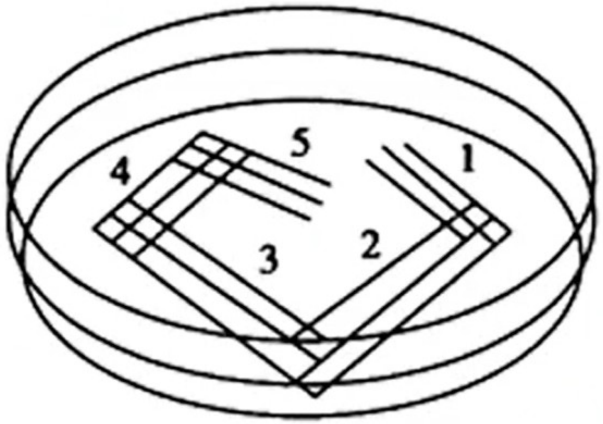
⑤ 试管口通过火焰，并塞上棉塞

⑥ 将皿盖打开一条缝隙，用接种环在培养基表面迅速划三至五条平行线，盖上皿盖



⑦ 灼烧接种环，待其冷却后，
从第一次划线的末端开始作第二次划线。重复以上操作，作第三、四、五次划线。

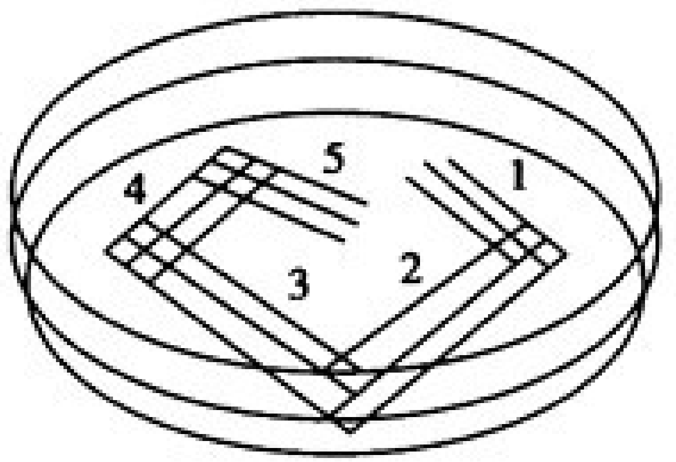
[illegible] → [illegible] → [illegible]



①每次划线的菌液均来自[illegible]，能使细菌数目随划线次数的增加而逐渐[illegible]，最终得到由单个细菌繁殖而来的菌落。

②最后一区[illegible]与第一区相连，不然将得不到单独的菌落；

③每次划线，均要[illegible]接种环，冷却的目的是[illegible]。



得到左图结果，需要：

1 、蘸取几次菌液？ **1** 次，第一次划线前

2 、接种环共需灼烧几次？ **6** 次

灼烧时期	目的
① 取菌种前	杀死接种环上原有的微生物
②-⑤ 每次划线前	杀死上次划线时残留菌种，
⑥ 接种结束后	使下一次划线的菌种直接来源上次划线的末端。 杀死接种环上残留的菌种，

避免细菌污染环境和感染操作者

制备培养基 接种和分离 培养酵母菌

完成平板划线后，待菌液被培养基吸收，
将接种后的平板和一个未接种的平板倒置，放入28℃左右的恒温培养箱中培养24~28h。

作对照，该培养皿无菌落说明培养基没有
污染

02

1g土壤中有多少能分解尿素的细菌？

分离：获得分解尿素的细菌的纯培养物

选择培养基

计数：测定分解尿素的细菌的数量

稀释涂布平板法

由于土壤细菌的数量庞大，要想得到特定微生物的纯培养物，必须要对土壤进行____________，然后再将菌液_______到制备好的_______________上。

一、制备选择培养基

培养基配方		
KH_2PO_4	1.4g	① 提供无机盐 ② 调节 pH
Na_2HPO_4	2.1g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g	
葡萄糖	10.0g	→ 提供碳源
尿素 $CO(NH_2)_2$	1.0g	→ 提供氮源
琼脂	15.0g	→ 凝固剂
蒸馏水	定容到 1000ml	

绝大多数微生物都能利用葡萄糖，但是只有能合成脲酶的微生物才能分解尿素。利用__以尿素为唯一氮源__的选择培养基，可以从土壤中分离出分解尿素的细菌。

[illegible]

[illegible]

1. 取样地点要求：

细菌适宜在酸碱度接近[illegible]__性的潮湿土壤中生长。

2. 取样土壤

铲去表层土，
细菌绝大部分分布在距地表3~8cm的土壤层

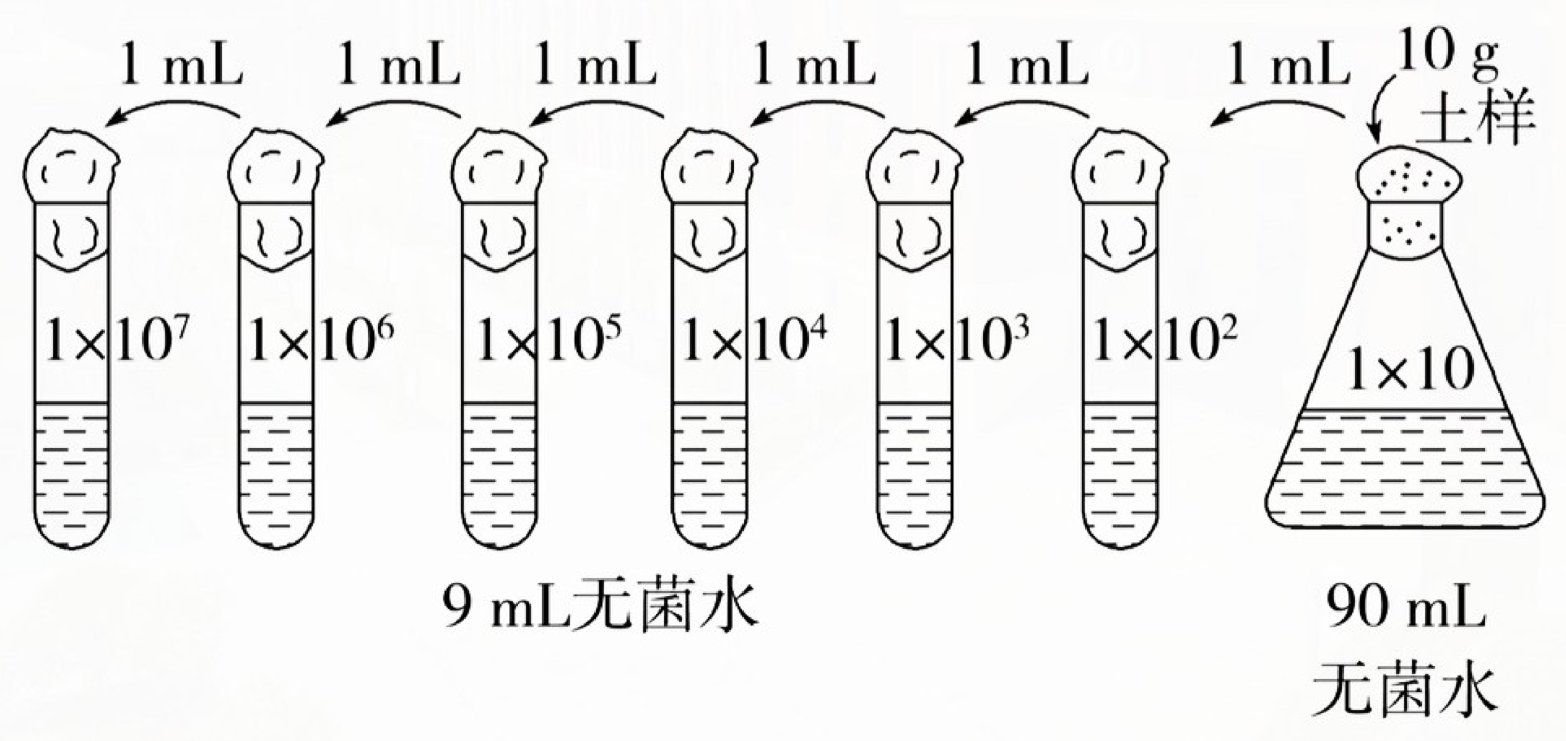
注意

取土样时用的铁铲和取样袋在使用前都需要灭菌。操作完成后，一定要洗手。

三、稀释涂布平板发操作步骤

①系列稀释操作： 该操作常用在将细胞接种到培养基之前，通过液体稀释的方法分散细胞，随着稀释程度的增大，单位体积中的微生物细胞数量___减少___，细胞得以分散。

操作步骤：



[illegible]

②涂布平板操作步骤

（1）吸取菌液的工具：

移液枪或者移液管

（2）涂布器在涂布前要经过哪些处

浸在酒精烧杯中，后将沾有少量酒

的涂布器在火焰上灼烧灭菌。

（3）为什么涂布器要冷却后再涂布

可防止高温杀死菌种

（4）涂布的菌液被培养基吸收后，

将平[illegible] 如何放置？ 倒置

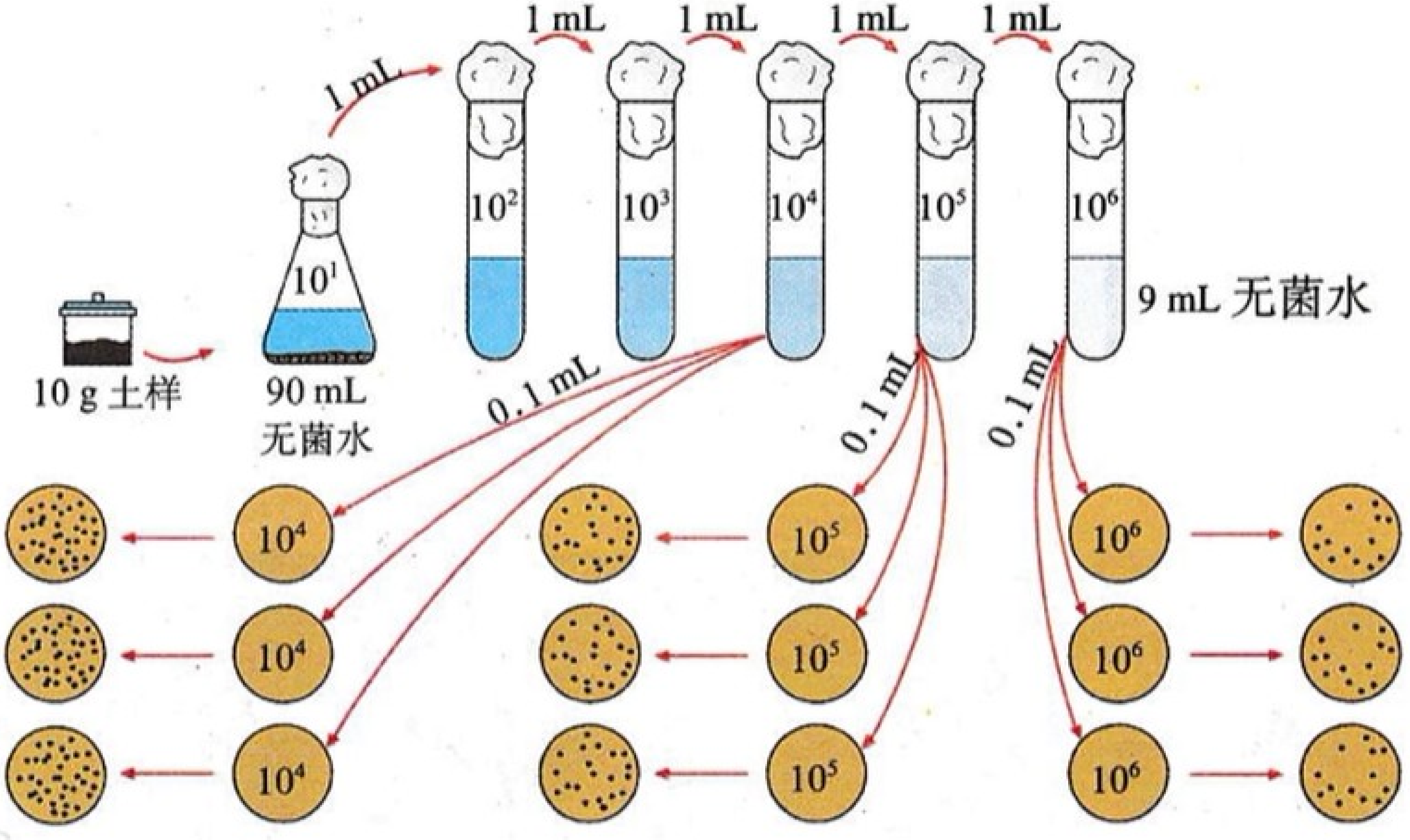
（5）需要设置对照组吗？每个稀释

需要涂布几个平板？

3个实验组＋1个对照组

□□□□□□□□□□□

1.□□□□



（1）一般选择数目为__________的平板进行计数

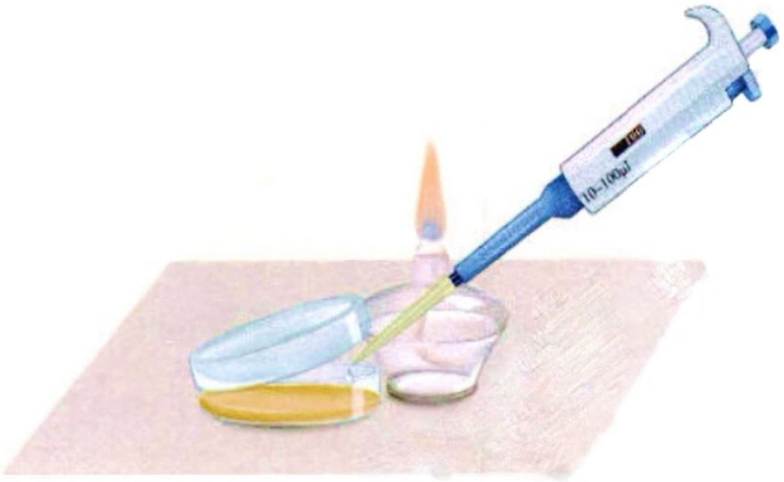
（2）至少对3个平板进行重复计数，然后求出平均值

□□□□□□□□□□

2. □□□□

(1) 当样品的稀释度足够高时，培养基表面生长的一个单菌落，来源于样品稀释液中的一个活菌。

(2) 通过统计平板上的菌落数，就能推测出样品中大约含有多少活菌。

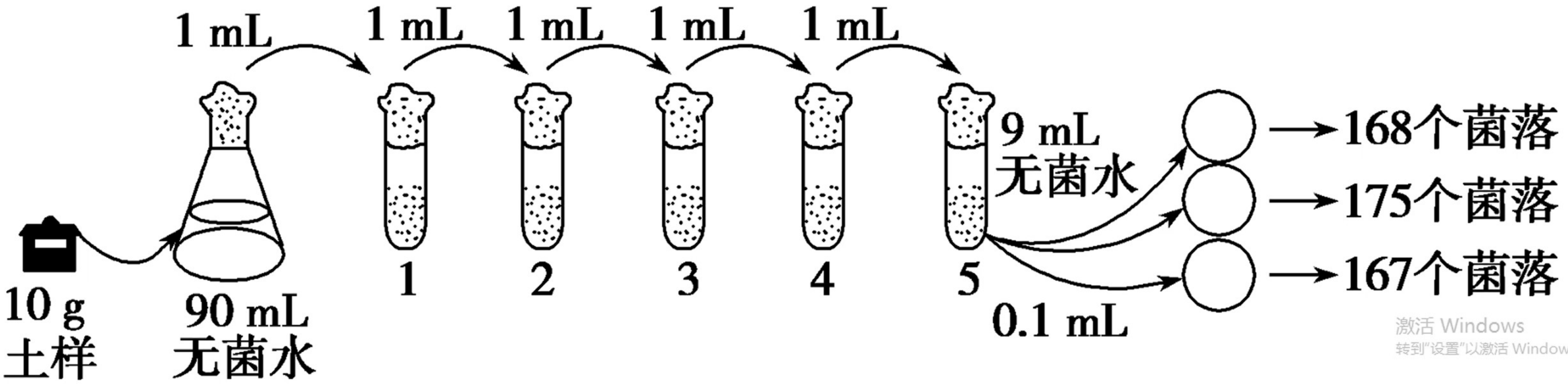


激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

[illegible]

3. [illegible]

下图为“土壤中分解尿素的细菌的分离与计数”实验中样品稀释示意图。据图分析，每克土壤中的菌株数约为多少？ 1.7×10^9个



激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

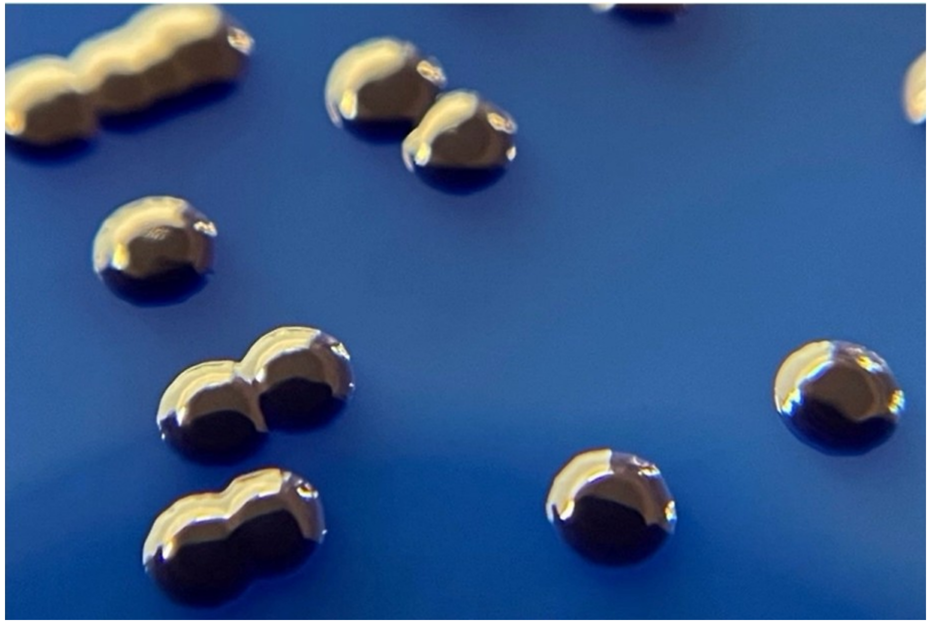
[illegible]

3. [illegible]

（1）统计的菌落数往往比活菌的实际数目[illegible]____；

原因：[illegible]______________________________

（2）统计结果一般用[illegible]________而不是用活菌数来表示；



激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

□□□□□□□□□□

计数方法	直接计数法	间接计数法
主要用具	显微镜、细菌计数板或血细胞计数板	涂布器
计数依据	细菌个数	培养基上菌落数
优点	计数方便、操作简单	计数的是活菌
计算公式	**每毫升**原液含菌株数＝每小格平均菌株数×400×10^4×稀释倍数	**每克**样品中的菌株数:$(C÷V)×M$ C:某稀释度下平板上生长的平均菌落数;V:涂布平板时所用的稀释液的体积(mL);M:稀释倍数
缺点	不能区分死菌与活菌	当两个或多个菌体连在一起时,平板上观察到的只是一个菌落
结果	比实际值偏大	比实际值偏小

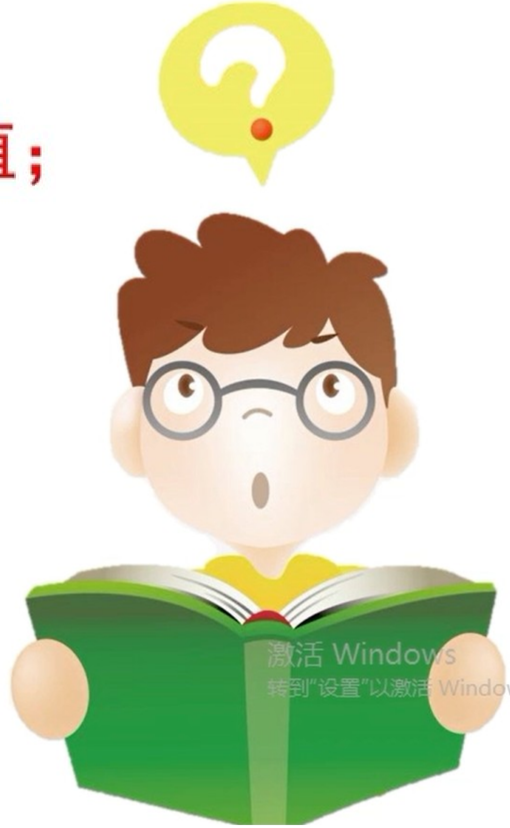
激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

在以尿素作为唯一氮源的培养基中分离出的微生物都是能分解尿素的吗？

不一定。

有些微生物可以利用其他微生物的代谢产物进行生长繁殖；

还可能是固氮菌



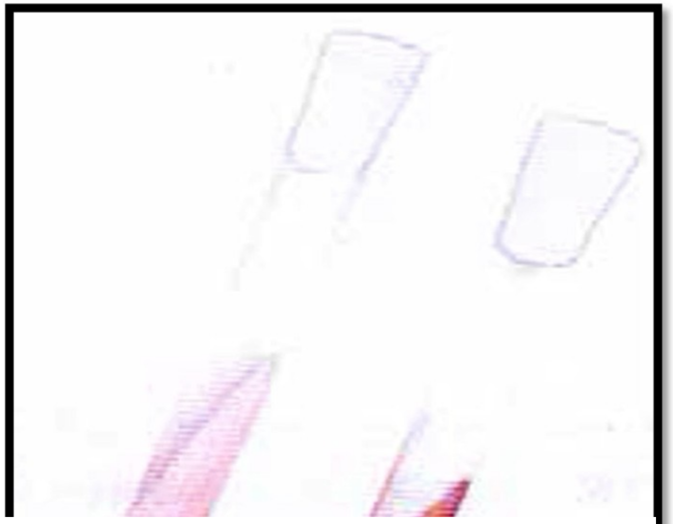
激活 Windows
转到“设置”以激活 Windows。

[illegible]

1.原理：

脲酶催化尿素分解成氨→培养基碱性增强→ 酚红变红→脲酶阳性

$$CO(NH_2)_2+H2O \xrightarrow{\text{脲酶}} CO_2+2NH_3$$



2.方法在以尿素为唯一氮源的培养基中加入酚红指示剂。培养某种细菌后，如果PH 升高，指示剂将变红，说明该细菌能够分解尿素。

①液体培养基可以直接看液体的变色情况；

②固体培养基上可以观察菌落周围是否出现红色环带，红色环带直径与菌落直径比值越大，说明分解能力越强。

激活 Windows
转到"设置"以激活 Windows。

□□□□

1.现在要从土壤中分离纤维素分解菌，请 你给出详细的实验方案。

土壤取样 →**富含纤维素**的环境

↓

选择培养 →以**纤维素**为**唯一碳源**，增加目的菌浓度（选择培养基）

↓

梯度稀释 →制备系列稀释液

↓

涂布平板 →将样品涂布到**含刚果红的培养基**上（鉴别培养基）

↓

挑选 →筛选产生**透明圈**的菌落